

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Appln. No: 10/577,840
Applicant: Pere Joan Cardona Iglesias et al.
Filed: May 1, 2006
Title: IMMUNOTHERAPEUTIC AGENT FOR THE COMBINED TREATMENT OF
TUBERCULOSIS IN ASSOCIATION WITH OTHER DRUGS (As Amended)
Docket No.: TJA-139US

CLAIM TO RIGHT OF PRIORITY

Mail Stop PCT
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

Pursuant to 35 U.S.C. § 119, Applicants hereby claim the benefit of prior PCT International Patent Application No. PCT/ES2004/000482, filed October 29, 2004.

A certified copy of the above-referenced application is enclosed.

Respectfully submitted,

RatnerPrestia



Jacques L. Etkowicz, Reg. No. 41,738
Attorney for Applicants

JLE/kpc

Enclosure: Certified Copy of Patent Application No. PCT/ES2004/000482

Dated: February 1, 2007

P.O. Box 980
Valley Forge, PA 19482-0980
(610) 407-0700

The Director is hereby authorized to charge or credit Deposit Account No. 18-0350 for any additional fees, or any underpayment or credit for overpayment in connection herewith..

EXPRESS MAIL

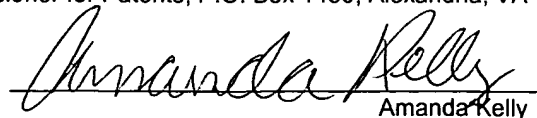
Mailing Label Number:

EV 579429248 US

Date of Deposit:

February 1, 2007

I hereby certify that this paper and fee are being deposited, under 37 C.F.R. § 1.10 and with sufficient postage, using the "Express Mail Post Office to Addressee" service of the United States Postal Service on the date indicated above and that the deposit is addressed to the Mail Stop Patent Application, Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450.



Amanda Kelly

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**MINISTRY OF
INDUSTRY,
TOURISM, AND
COMMERCE**

**SPANISH PATENT
AND
TRADEMARKS
OFFICE**

OFFICIAL COPY

I certify that the attached documents herewith are an accurate copy of the ones held in the file of the INVENTION PATENT No. PCT/ES2004/000482, filed in these premises on October 29, 2004.

INDICACION OF PRIORITY. The code of the country of its request of priority, that is to be used for the presentation of requests in other countries by virtue of the Agreement of Paris, is: ES2004/000482.

Madrid, June 20, 2006

**The Director of the Patents
Department and Technology
Information.
P.D.**

**(Illegible signature)
ANA M^a REDONDO
MÍNGUEZ**

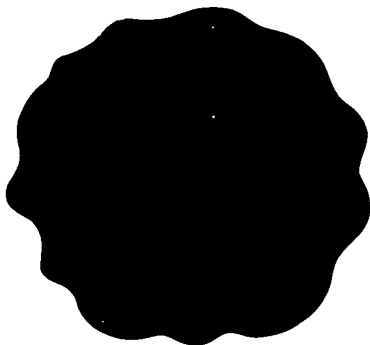
THIS PAGE BLANK (USPTO)

CERTIFICADO OFICIAL

Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de la solicitud internacional número PCT/ES2004/000482, que tiene fecha de presentación internacional en este Organismo el 2004-10-29.

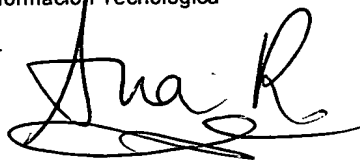
INDICACIÓN DE PRIORIDAD: El código del país con el número de su solicitud de prioridad, que ha de utilizarse para la presentación de solicitudes en otros países en virtud del Convenio de París, es: ES2004/000482.

Madrid, 20 de Junio de 2006



El Director del Departamento de Patentes
e Información Tecnológica

P.D.



ANA Mª REDONDO MÍNGUEZ

THIS PAGE BLANK (USPTO)

COPIA PARA LA OFICINA RECEPTORA

PCT

PETITORIO

El abajo firmante pide que la presente solicitud internacional sea tramitada con arreglo al Tratado de Cooperación en materia de Patentes.



Para uso de la Oficina receptora únicamente

PCT/ES.2004/000482

Solicitud internacional N°

29 OCT 2004

(29.10.2004)

Fecha de presentación internacional

DEMANDE INTERNATIONALE PCT
SOLICITUD INTERNACIONAL PCT

Nombre de la Oficina receptora y "Solicitud internacional PCT"

Referencia al expediente del solicitante o del mandatario (si se desea)
(como máximo, 12 caracteres) 04-2352

Recuadro N° I TÍTULO DE LA INVENCIÓN
AGENTE INMUNOTERÁPICO ÚTIL PARA EL TRATAMIENTO COMBINADO DE LA
TUBERCULOSIS EN ASOCIACIÓN CON OTROS FÁRMACOS

Recuadro N° II SOLICITANTE☐ Esta persona también es inventor.

Nombre y dirección: (apellido seguido del nombre; si se trata de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección deben figurar el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este recuadro es el Estado de domicilio del solicitante si no se indica más abajo el Estado de domicilio.)

ARCHIVEL TECHNOLOGIES, SL
Ctra. de la Mata, 97 - Edif. Matamar, 2
P.I. Mata-Rocafonda
08304 MATARÓ (Barcelona)
ESPAÑA^A

N° de teléfono

34 937907522

N° de facsímil

34 937908632

N° de teleimpresora

N° de registro del solicitante en la Oficina

Estado de nacionalidad (nombre del Estado):

ES

Estado de domicilio (nombre del Estado):

ES

Esta persona es
solicitante para:☐ todos los Estados
designados☒ todos los Estados designados salvo
los Estados Unidos de América☐ los Estados Unidos de
América únicamente☐ los Estados indicados en
el recuadro suplementario**Recuadro N° III OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)**

Nombre y dirección: (apellido seguido del nombre; si se trata de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección deben figurar el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este recuadro es el Estado de domicilio del solicitante si no se indica más abajo el Estado de domicilio.)

CARDONA IGLESIAS, Pere Joan
Ctra. de la Mata, 97 - Edif. Matamar, 2
P.I. Mata-Rocafonda
08304 MATARÓ (Barcelona)
ESPAÑA^A

Esta persona es:

☐ solicitante únicamente☒ solicitante e inventor☐ inventor únicamente (si se marca esta
casilla, no se debe rellenar lo que sigue.)

N° de registro del solicitante en la Oficina

Estado de nacionalidad (nombre del Estado):

ES

Estado de domicilio (nombre del Estado):

ES

Esta persona es
solicitante para:☐ todos los Estados
designados☐ todos los Estados designados salvo
los Estados Unidos de América☒ los Estados Unidos de
América únicamente☐ los Estados indicados en
el recuadro suplementario☒ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja de continuación.**Recuadro N° IV MANDATARIO O REPRESENTANTE COMÚN; O DIRECCIÓN PARA LA CORRESPONDENCIA**

La persona abajo identificada se nombra/ha sido nombrada para actuar en nombre del/de los solicitante(s) ante las administraciones internacionales competentes como:

☒ mandatario☐ representante común

Nombre y dirección: (apellido seguido del nombre; si se trata de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección deben figurar el código postal y el nombre del país.)

TORNER LASALLE, Elisabet (08230)^{AA}
c/ Bruc, 21
08010 BARCELONA (España)

N° de teléfono

34 933426550

N° de facsímil

34 933016965

N° de teleimpresora

N° de registro del mandatario en la Oficina

☐ Dirección para la correspondencia: márquese esta casilla cuando no se nombre/se haya nombrado ningún mandatario o representante común y el espacio de arriba se utilice en su lugar para indicar una dirección especial a la que deba enviarse la correspondencia.

Ro

AA SUPRIMIDO POR RO

Continuación del recuadro N° III OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)

Si no se ha de utilizar ninguno de estos subrecuadros, esta hoja no debe ser incluida en el petitorio.

Nombre y dirección: (apellido seguido del nombre; si se trata de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección deben figurar el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este recuadro es el Estado de domicilio del solicitante si no se indica más abajo el Estado de domicilio.)

MATA RIERA, Isabel

Esta persona es:

- ☐ solicitante únicamente
☒ solicitante e inventor
☐ inventor únicamente (si se marca esta casilla, no se debe rellenar lo que sigue.)

N° de registro del solicitante en la Oficina

Estado de nacionalidad (nombre del Estado):
 ES

Estado de domicilio (nombre del Estado):
 ES

Esta persona es solicitante para: ☐ todos los Estados designados ☐ todos los Estados designados salvo los Estados Unidos de América ☒ los Estados Unidos de América únicamente ☐ los Estados indicados en el recuadro suplementario

Nombre y dirección: (apellido seguido del nombre; si se trata de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección deben figurar el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este recuadro es el Estado de domicilio del solicitante si no se indica más abajo el Estado de domicilio.)

Esta persona es:

- ☐ solicitante únicamente
☐ solicitante e inventor
☐ inventor únicamente (si se marca esta casilla, no se debe rellenar lo que sigue.)

N° de registro del solicitante en la Oficina

Estado de nacionalidad (nombre del Estado):

Estado de domicilio (nombre del Estado):

Esta persona es solicitante para: ☐ todos los Estados designados ☐ todos los Estados designados salvo los Estados Unidos de América ☐ los Estados Unidos de América únicamente ☐ los Estados indicados en el recuadro suplementario

Nombre y dirección: (apellido seguido del nombre; si se trata de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección deben figurar el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este recuadro es el Estado de domicilio del solicitante si no se indica más abajo el Estado de domicilio.)

Esta persona es:

- ☐ solicitante únicamente
☐ solicitante e inventor
☐ inventor únicamente (si se marca esta casilla, no se debe rellenar lo que sigue.)

N° de registro del solicitante en la Oficina

Estado de nacionalidad (nombre del Estado):

Estado de domicilio (nombre del Estado):

Esta persona es solicitante para: ☐ todos los Estados designados ☐ todos los Estados designados salvo los Estados Unidos de América ☐ los Estados Unidos de América únicamente ☐ los Estados indicados en el recuadro suplementario

Nombre y dirección: (apellido seguido del nombre; si se trata de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección deben figurar el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este recuadro es el Estado de domicilio del solicitante si no se indica más abajo el Estado de domicilio.)

Esta persona es:

- ☐ solicitante únicamente
☐ solicitante e inventor
☐ inventor únicamente (si se marca esta casilla, no se debe rellenar lo que sigue.)

N° de registro del solicitante en la Oficina

Estado de nacionalidad (nombre del Estado):

Estado de domicilio (nombre del Estado):

Esta persona es solicitante para: ☐ todos los Estados designados ☐ todos los Estados designados salvo los Estados Unidos de América ☐ los Estados Unidos de América únicamente ☐ los Estados indicados en el recuadro suplementario

☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en otra hoja de continuación.

Recuadro N° IX LISTA DE VERIFICACIÓN; IDIOMA DE PRESENTACIÓN

La presente solicitud internacional contiene:	La presente solicitud internacional va acompañada del(los) siguiente(s) documento(s) (marcar las casillas que procedan e indicar en la columna de la derecha el número de cada documento):	Número de documentos
a) el siguiente número de hojas en papel :	1. <input checked="" type="checkbox"/> hoja de cálculo de tasas :	1
petitorio (incluidas las hojas de declaración) :	2. <input type="checkbox"/> poder separado original :	
descripción (excluidas la lista de secuencias y los cuadros conexos) :	3. <input type="checkbox"/> poder general original :	
reivindicaciones :	4. <input type="checkbox"/> copia del poder general; número de referencia, en su caso: :	
resumen :	5. <input type="checkbox"/> declaración explicativa de la ausencia de firma :	
dibujos :	6. <input type="checkbox"/> documento(s) de prioridad identificado(s) en el Recuadro N° VI como punto o puntos: :	
Número subtotal de hojas :	7. <input type="checkbox"/> traducción de la solicitud internacional al (idioma) : :	
Lista de secuencias :	8. <input type="checkbox"/> indicaciones separadas relativas a microorganismos depositados o a otro material biológico :	
Cuadros conexos :	9. <input type="checkbox"/> lista de secuencias en formato legible por ordenador (indicar el tipo y el número de soportes) :	
(para ambas enumeraciones, número total de hojas si éstas han sido presentadas en papel, con independencia de que también se presentaran en formato legible por ordenador; ver c) abajo)	i) <input type="checkbox"/> copia presentada para la búsqueda internacional, según la Regla 13ter sólo (y no como parte de la solicitud internacional) :	
Número total de hojas :	ii) <input type="checkbox"/> (sólo cuando se ha marcado la casilla b)ii) o c)ii) en la columna de la izquierda) copias adicionales, incluyendo, cuando proceda, la copia para la búsqueda internacional según la Regla 13ter :	
	iii) <input type="checkbox"/> junto a la declaración que proceda sobre la identidad de la copia - o copias - respecto de la lista de secuencias mencionada en la columna de la izquierda :	
b) <input type="checkbox"/> sólo en formato legible por ordenador (según la Instrucción 801.a)i):	10. <input type="checkbox"/> cuadros conexos, en formato legible por ordenador, a la lista de secuencias (indicar el tipo y el número de soportes) :	
i) <input type="checkbox"/> lista de secuencias	i) <input type="checkbox"/> copias presentadas para la búsqueda internacional según la Instrucción 802.b-quater) sólo (y no como parte de la solicitud internacional) :	
ii) <input type="checkbox"/> cuadros conexos	ii) <input type="checkbox"/> (sólo cuando se ha marcado la casilla b)ii) o c)ii) en la columna de la izquierda) copias adicionales, incluyendo, cuando proceda, la copia para la búsqueda internacional, según la Instrucción 802.b-quater) :	
c) <input type="checkbox"/> asimismo en formato legible por ordenador (según la Instrucción 801.a)ii):	iii) <input type="checkbox"/> junto a la declaración que proceda sobre la identidad de la copia - o copias - respecto de los cuadros mencionados en la columna de la izquierda :	
i) <input type="checkbox"/> listas de secuencias	11. <input type="checkbox"/> otros (especifíquese): :	
ii) <input type="checkbox"/> cuadros conexos		
Tipo y número de soportes (disquete, CD-ROM, CD-R u otros) que contienen las:		
i) <input type="checkbox"/> lista de secuencias:		
ii) <input type="checkbox"/> cuadros conexos:		
(las copias adicionales se deben indicar en los puntos 9.ii) y/o 10.ii) de la columna de la derecha)		
Figura de los dibujos que debe acompañar el resumen:	Idioma de presentación de la solicitud internacional:	ES

Recuadro N° X FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL MANDATARIO O DEL REPRESENTANTE COMÚN

Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio).


 TORNER LASALLE, ELISABET (0823/0)

Para uso de la Oficina receptora únicamente		2. Dibujos: <input type="checkbox"/> recibidos: <input type="checkbox"/> no recibidos:
1. Fecha efectiva de recepción de la pretendida solicitud internacional:	29 OCT 2004 (29.10.2004)	
3. Fecha efectiva de recepción, rectificada en razón de la recepción ulterior, pero dentro de plazo, de documentos o de dibujos que completen la pretendida solicitud internacional:		
4. Fecha de recepción, dentro de plazo, de las correcciones requeridas según el Artículo 11.2) del PCT:		
5. Administración encargada de la búsqueda internacional especificada por el solicitante: ISA / ES	6. <input type="checkbox"/> Transmisión de la copia para la búsqueda diferida hasta que se pague la tasa de búsqueda.	

Para uso de la Oficina Internacional únicamente
Fecha de recepción del ejemplar original por la Oficina Internacional:

**AGENTE INMUNOTERÁPICO ÚTIL PARA EL TRATAMIENTO
COMBINADO DE LA TUBERCULOSIS EN ASOCIACIÓN CON OTROS
FÁRMACOS**

5 Campo de la técnica

La presente invención se refiere a un procedimiento para preparar un agente inmunoterápico útil para el tratamiento combinado de la tuberculosis en asociación con otros fármacos, basado en fragmentos de pared celular de una cepa virulenta de *Mycobacterium tuberculosis*-complex, y en el agente inmunoterápico
10 obtenible mediante dicho procedimiento.

Estado de la técnica anterior

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa crónica ocasionada por los bacilos *Mycobacterium tuberculosis*-complex (MTB-C), que incluyen actualmente a las
15 especies *M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.microti* y *M.africanum*.

Según la Organización Mundial de la Salud, en el mundo se registran anualmente 8.000.000 de nuevos casos de personas que manifiestan la enfermedad y mueren unos 3.000.000 de personas. Se considera que en el mundo existen 2.000.000.000 de personas infectadas.

20 La vacuna actual que se emplea en el tratamiento preventivo contra la tuberculosis está basada en bacterias de la cepa denominada BCG (Bacilo de Calmette-Guerin), una variante atenuada de *M.bovis*.

Según WO-A-03018053, dicha vacuna constituye el mejor método disponible actualmente para inducir inmunoprotección frente a la tuberculosis, aunque
25 la seguridad y la eficacia de la misma en su aplicación en humanos es objeto de controversia en algunos países, ya que no protege bien a los adultos contra la tuberculosis pulmonar.

Por otra parte en WO-A-03004520 se comenta como hecho conocido que el tratamiento más efectivo para combatir la tuberculosis en personas infectadas, tanto
30 las que no han desarrollado todavía la enfermedad como las que ya la han desarrollado, es la administración de varios fármacos, entre ellos la isoniacida, durante un período de tiempo que se prolonga varios meses.

Dicho tipo de tratamiento prolongado podría favorecer el desarrollo de microorganismos resistentes a dichos fármacos en el caso de no realizar el tratamiento hasta el final y, además, los citados fármacos actúan solamente en el momento en que el bacilo tiene un metabolismo activo, es decir cuando está en fase de crecimiento, pero no cuando está en una fase no activa. Esto representa un inconveniente significativo, ya que en el proceso de la infección de la tuberculosis conviven bacilos en fase de metabolismo activo y en fase no activa.

Un intento para resolver los problemas planteados, según se describe en la patente US4724144, consiste en el uso de un agente inmunoterápico basado en células muertas de *M.vaccae* como adyuvante del tratamiento de la tuberculosis junto con la administración de otros fármacos, por ejemplo, rifampicina e isoniácida.

Sin embargo, en la patente US6001361 se describe que dicho agente adyuvante no se ha empleado para vacunar masivamente a las personas contra la tuberculosis, y que hay poca información sobre su eficacia.

Existe pues la necesidad de disponer de un agente inmunoterápico para el tratamiento de la tuberculosis que actúe como coadyuvante de los fármacos que no favorezca el desarrollo de microorganismos resistentes y que sea capaz de generar respuesta inmunológica incluso contra los bacilos que se hallan en fase no activa.

Los autores de la presente invención han descubierto un procedimiento que permite preparar un nuevo agente inmunoterápico útil para el tratamiento combinado de la tuberculosis en asociación con otros fármacos, que comprende fragmentos de pared celular de una cepa virulenta de MTB-C, capaz de aumentar la eficacia de los fármacos asociados al generar una respuesta inmunológica efectiva contra los bacilos que no están en fase de metabolismo activo, lo que además reduce el riesgo de aparición de resistencia.

Objeto de la invención

Es objeto de la presente invención un procedimiento para la obtención de un agente inmunoterápico que comprende fragmentos de pared celular de una cepa virulenta de MTB-C, que resulta útil en el tratamiento combinado de la tuberculosis en asociación con otros fármacos.

También forman parte del objeto de la presente invención el agente inmunoterápico obtenible según el procedimiento anterior y el uso del mismo para la

preparación de un medicamento para el tratamiento combinado de la tuberculosis en asociación con otros fármacos.

Otro objeto adicional son las composiciones farmacéuticas que contienen dicho agente inmunoterápico.

5

Descripción detallada de la invención

Los autores de la presente invención han descubierto un procedimiento para la obtención de un agente inmunoterápico que comprende fragmentos de pared celular de una cepa virulenta de *Mycobacterium tuberculosis*-complex (MTB-C), dicho procedimiento caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

10

- el cultivo de la cepa virulenta MTB-C durante un período de tiempo igual o superior a tres semanas y, posteriormente,
- la homogeneización del cultivo de células en presencia de un tensioactivo no iónico.

15

La cepa virulenta puede ser cualquier cepa virulenta de MTB-C, ya que el bacilo de la tuberculosis es muy estable y no se ha descrito la aparición de mutaciones en compuestos inmunogénicos. Una de las cepas mas utilizadas por los investigadores en este campo, considerada como cepa virulenta de referencia, es la denominada H37Rv que, por ejemplo, puede ser libremente adquirida en la National Collection of Type Cultures (NCTC), Londres, Gran Bretaña (número de depósito NC007416).

20

La cepa virulenta se puede cultivar por inoculación en medios de cultivo bien conocidos por el experto en la materia. Puede tratarse de un medio sólido, como por ejemplo el agar Middlebrook tipo 7H10 o tipo 7H11, o de un medio líquido, por ejemplo el medio de cultivo Sauton o el medio de cultivo Proskauer-Beck.

25

A los efectos de la presente invención, el cultivo debe efectuarse durante un período de tiempo igual o superior a tres semanas, preferiblemente comprendido entre 3 y 4 semanas. La temperatura del cultivo se mantiene, preferiblemente, entre 34° C y 38° C.

30

Una vez finalizado el cultivo, si éste se ha realizado en fase sólida, se procede al raspado de las placas para obtener las colonias, evitando la extracción de medio (agar) al mismo tiempo. Si el cultivo se ha realizado en fase líquida, se procede a la concentración y lavado de las células empleando técnicas convencionales conocidas por el experto en la materia, como por ejemplo, la centrifugación.

La homogeneización de las células se lleva a cabo en un medio tamponado a un pH neutro, siendo importante a los efectos de la presente invención que dicha homogeneización se efectúe en presencia de un tensioactivo no iónico que favorece la obtención de partículas de pared celular finamente divididas y emulsiona, al menos en parte, fracciones lipídicas indeseadas.

Mediante este proceso de homogeneización se rompen las células de MTB-C y se obtienen fragmentos pequeños de pared celular.

La homogeneización puede llevarse a cabo mediante sonicación por ultrasonidos, o mediante la utilización de pequeñas bolas de aproximadamente 1 mm de diámetro, por ejemplo, de sílice o de sílice-zirconio, conjuntamente con un homogeneizador mecánico. Un homogeneizador mecánico que se puede utilizar, por ejemplo, es el modelo BEADBEATER de la empresa Biospec.

El medio tamponado está constituido, por ejemplo, por tampón PBS (solución salina de tampón fosfato).

El tipo de tensioactivo no iónico utilizado no resulta crítico, aunque preferiblemente se selecciona entre el grupo de los alquifenoles etoxilados y los ésteres de sorbitán etoxilados. De manera más preferible el tensioactivo no iónico se selecciona entre los octilfenoles etoxilados. Más preferiblemente se emplean octilfenoles etoxilados con 7-8 moles de óxido de etileno, que se encuentran en el mercado bajo el nombre de, por ejemplo, TRITON X-114. El contenido en tensioactivo no iónico en la etapa de homogeneización está comprendido entre el 1 y el 5 % en peso respecto del total del homogeneizado.

La masa homogeneizada, que contiene ya los fragmentos de pared celular deseados, se somete a un tratamiento convencional con el fin de separar dichos fragmentos de las células no fragmentadas y los componentes solubilizados.

Por ejemplo, después de haber separado por decantación las bolas de sílice o de sílice-zirconio, caso de haberlas utilizado, el producto resultante de la homogeneización se centrifuga suavemente a una velocidad inferior a 5.000 rpm para eliminar como sedimento las células no fragmentadas.

A continuación, el sobrenadante resultante se centrifuga a una velocidad de centrifugación más elevada, por ejemplo superior a 15.000 rpm, para eliminar los elementos solubilizados, que se concentran en el líquido sobrenadante, mientras que los fragmentos de pared celular se concentran en el sedimento. Empleando técnicas

habituales conocidas por el experto en la materia, como son el lavado con tampón PBS y centrifugación, este proceso puede repetirse varias veces hasta la obtención de un sobrenadante completamente transparente, que se rechaza.

El sedimento obtenido, que contiene los fragmentos de pared celular, se dispersa en tampón PBS y se somete a un proceso químico, por ejemplo mediante tratamiento con formol, o físico, por ejemplo mediante tratamiento en autoclave o pasteurización, que asegure la total inactivación de las células de MTB-C que hubieran podido permanecer viables tras el proceso de fragmentación y de purificación.

Finalmente, la dispersión de fragmentos de pared celular en tampón PBS se distribuye en viales y se liofiliza a una temperatura comprendida entre -15°C y -25°C y con un vacío comprendido entre 0,1 y 0,5 mbar.

Se obtienen viales que contienen fragmentos de pared celular de MTB-C que constituyen el agente inmunoterápico de la invención, y se conservan a -70°C .

A partir del agente inmunoterápico de la invención pueden prepararse composiciones farmacéuticas, también objeto de la invención, que pueden formularse en forma de emulsión tipo aceite en agua (O/W) o en forma de liposomas. Resultan preferidas las composiciones farmacéuticas en forma de liposomas.

La formación de liposomas puede efectuarse empleando técnicas convencionales, bien conocidas por el experto. Por ejemplo, los liposomas pueden formarse mezclando en un medio acuoso los fragmentos de pared celular liofilizados y los lípidos auxiliares para la formación de liposomas, y sometiendo la mezcla a un procedimiento estándar de homogeneización, por ejemplo, mediante el uso de un agitador de alta velocidad.

Los lípidos auxiliares para fabricar liposomas son ampliamente conocidos por el experto en la materia. En general, se incluyen fosfolípidos, con carga neta neutra y/o negativa, y esteroides.

Los fosfolípidos empleados pueden ser, por ejemplo: la fosfatidilcolina, la fosfatidilserina y el fosfatidilinositol.

Habitualmente, el componente mayoritario de los liposomas es la fosfatidilcolina, que puede ser sintetizada o aislada de fuentes naturales. Un producto comercial frecuentemente usado es la lecitina de soja.

Los esteroides que se emplean en la preparación de liposomas pueden ser, entre otros, el colesterol y las sales biliares.

Preferiblemente, los liposomas se forman empleando una mezcla de lecitina de soja y colato sódico.

Opcionalmente los liposomas pueden contener aditivos que mejoren su estabilidad, por ejemplo: la vitamina E, que actúa de antioxidante de los lípidos.

5 Los liposomas obtenidos presentan una distribución de tamaño en la que el 99,9 % son más pequeños que 1 micra.

Los liposomas se pueden someter a liofilización para obtener de este modo el agente inmunoterápico objeto de la invención en forma de liposomas liofilizados.

10 Forma parte también del objeto de la invención el uso del agente inmunoterápico para la preparación de un medicamento para el tratamiento combinado de la tuberculosis en asociación con otros fármacos.

De manera preferible, sin que ello descarte otras vías de administración, el agente inmunoterápico objeto de la invención se administra por vía parenteral.

15 De entre los fármacos antituberculosos conocidos, resultan preferidos para el tratamiento combinado con el agente terapéutico de la invención la isoniacida y la rifampicina.

La asociación del agente inmunoterápico de la invención con los fármacos antituberculosos para el tratamiento combinado de la enfermedad puede
20 llevarse a cabo de manera simultánea o de manera secuencial, es decir mediante la administración simultánea de los fármacos y del agente inmunoterápico, o mediante la administración previa de los fármacos seguida de la administración del agente inmunoterápico.

Sorprendentemente, se ha encontrado que el tratamiento combinado de
25 la tuberculosis, mediante la administración del agente inmunoterápico de la invención asociado con fármacos para el tratamiento de la tuberculosis, aumenta la eficacia de dichos fármacos al generar una respuesta inmunológica contra los bacilos que no están en fase de metabolismo activo, lo que además reduce el riesgo de desarrollo de resistencia.

30 Los ejemplos que siguen a continuación se expone a efectos de proporcionar al experto en la materia una explicación detallada de realizaciones concretas dentro de la invención.

Ejemplo 1.- Obtención del agente inmunoterápico

Se inoculan unas 80 – 100 placas de agar Middlebrook del tipo 7H11 con un cultivo de H37Rv suministrado por la National Collection of Type Cultures (NCTC), Londres, Gran Bretaña (número de depósito NC007416). La concentración de unidades formadoras de colonias inoculada en cada placa es de 10^5 - 10^6 UFC. Las placas se incuban durante 21 días (3 semanas) a una temperatura comprendida entre 34° C y 38° C.

Después del período de incubación, se extraen las colonias de las placas de agar mediante una espátula, con la precaución de no extraer medio de cultivo. Se obtienen entre 15 y 18 g de extracto crudo.

El extracto crudo se dispersa en aproximadamente 20 mL de tampón PBS que contiene un 4 % en peso de TRITON X-114. Se añaden unos 35 mL de bolas de sílice-zirconio de 1 mm de diámetro y se procede a la homogeneización mecánica con el homogeneizador BEADBEATER, de la empresa Biospec.

El proceso de homogeneización se continúa hasta que en la tinción de una muestra con la técnica de Ziehl-Neelsen se detecten menos de 5 bacilos enteros después de observar 100 campos a 1000 aumentos.

El producto resultante de la homogeneización se separa de las bolas de sílice-zirconio por decantación. Éstas se lavan con la solución tampón PBS conteniendo un 4 % en peso de TRITON X-114, y las aguas de lavado se reúnen con el producto, obteniéndose un volumen total de unos 80-100 mL.

A continuación, el producto resultante de la homogeneización más las aguas de lavado se centrifuga a 3.000 rpm durante 30 minutos en una centrifuga refrigerada a 4° C, para eliminar las células no fragmentadas en el sedimento.

Se conserva el sobrenadante.

A continuación, dicho sobrenadante se centrifuga a 15.100 rpm (equivalente a 27.000 g) durante 60 minutos a 4° C, obteniéndose un sedimento blanquecino, que contiene los fragmentos de pared celular

Se conserva el sedimento, y se elimina el sobrenadante amarillento.

El sedimento se lava primero con tampón PBS (3 x 3 mL), se redispersa en 3 mL de dicha solución tampón, se enrasa a 20 mL con tampón PBS y se vuelve a centrifugar a 15.100 rpm durante 60 minutos a 4° C.

Se rechaza el sobrenadante obtenido.

Se repite nuevamente la operación de lavado y centrifugado, de forma que el sobrenadante obtenido es completamente transparente y se rechaza.

El sedimento, que contiene los fragmentos de pared celular, se lava con tampón PBS (3x3 mL) y se redispersa en 12 mL de tampón PBS.

5 Después del proceso de centrifugación y lavado, se reúne la dispersión de los fragmentos de pared celular en tampón PBS en un recipiente y se pasteuriza por tratamiento a 65° C durante 1 hora.

10 A continuación se enfría rápidamente la mezcla en un baño de hielo, y se distribuye la dispersión de fragmentos de pared celular en criotubos a razón de 1 mL por criotubo.

La dispersión de fragmentos de pared celular contenida en los criotubos se congela a -70° C y se somete a un proceso de liofilización a una temperatura comprendida entre -15 y -22° C y a un vacío comprendido entre 0,180 y 0,400 mbar.

Se obtienen entre 1 y 1,5 g de agente inmunoterápico.

15

Ejemplo 2.- Obtención de liposomas del agente inmunoterápico

Se pesan entre 740 y 770 mg del producto obtenido en el Ejemplo 1 en un vaso de precipitados al que se le añaden 20 mL de una dispersión de lecitina de soja calidad farmacéutica en etanol (1 kg de lecitina en 1 litro de etanol absoluto), y 7 mL de una disolución de colato sódico de calidad farmacéutica en agua (200 g de colato sódico en 1 litro de agua bidestilada).

20

Se ajusta el pH a un valor comprendido entre 7,7 y 8 con una disolución de HCl 0,997 N.

25 Se preparan los liposomas mediante homogeneización con un agitador de alta velocidad.

La dispersión de liposomas así obtenida se diluye al 10 % con agua bidestilada y se ajusta el pH a un valor comprendido entre 7,1 y 7,3 con una disolución de HCl 0,0997 N.

30 Se distribuye la dispersión de liposomas en criotubos a razón de 0,5 mL por tubo y se congela a -80° C.

Posteriormente se liofiliza y se obtiene el agente inmunoterápico, objeto de la invención, en forma de liposomas.

Ejemplo 3.- Efectividad del agente inmunoterápico como adyuvante del tratamiento con fármacos

En el modelo de infección se utilizan ratones hembra de 6 a 8 semanas de edad de los tipos BALB/c, 129/Sv, C57BL/6 y DBA/2, libres de patógenos específicos.

5 Una cepa virulenta de *Mycobacterium tuberculosis* se cultiva en medio Proskauer-Beck hasta una fase media logarítmica, y se conserva en alícuotas de 1 mL a -70° C hasta su utilización.

Los ratones se infectan por aerosol mediante su ubicación en un aparato Middelbrook de infección por aerosol que proporciona un inóculo aproximado de 10-50
10 bacilos viables en los pulmones.

La concentración bacilar, es decir, el número de bacilos viables, se determina incubando diluciones seriadas de homogeneizados de pulmón izquierdo y bazo en agar Middelbrook 7H11. La homogeneización del pulmón izquierdo y del bazo se llevan a cabo en presencia de 1 mL de tampón PBS.

15

I) Tratamiento con una dosis de agente inmunoterápico liposomado simultáneamente con isoniácida

Se dividieron los ratones infectados del tipo BALB/c en tres grupos:

- Tratados solamente con isoniácida a razón de 25 mg /kg y día durante 5 días a la
20 semana durante 6 semanas (Control),
- Tratados con isoniácida a razón de 25 mg /kg y día durante 5 días a la semana durante 6 semanas y además con una dosis intranasal de 180 µg de agente inmunoterápico liposomado, objeto de la invención, y
- Tratados con isoniácida a razón de 25 mg /kg y día durante 5 días a la semana
25 durante 6 semanas y además con una dosis intraperitoneal 180 µg de agente inmunoterápico liposomado, objeto de la invención

El tratamiento con el antibiótico isoniácida se inició en la semana 9 y se continuó hasta la semana 15.

La dosis del agente inmunoterápico liposomado, objeto de la invención,
30 se administró en la semana 13.

A la semana 15, los animales fueron sacrificados y se determinaron las concentraciones bacilares en el pulmón izquierdo y en el bazo de mismos.

Las concentraciones bacilares, determinadas según el método descrito en la introducción al apartado C, fueron significativamente menores en los pulmones de los animales vacunados, mientras que en el bazo, los resultados comparados con el grupo Control, no fueron estadísticamente diferentes.

5

Los resultados, expresados en UFC/mL, se muestran en la Tabla 1:

Tabla 1

Grupo de ratones	Pulmón	Bazo
Control	7,5±2,89	0,75±0,33
Intranasal	≤ 2±0*	0,4±0,2
Intraperitoneal	≤ 2±0*	0,52±0,44
* = valor estadísticamente significativo con respecto al grupo Control, para p<0,05		

10

Se puede observar que los ratones tratados por vía intranasal y por vía intraperitoneal con el agente inmunogénico liposomado, objeto de la invención, simultáneamente con el tratamiento con isoniácida, presentan un número de bacilos en los pulmones considerablemente inferior al de los ratones que solamente han sido tratados con el antibiótico isoniácida.

15

Teniendo en cuenta, que el número de bacilos determinado incluye a los que están en fase activa y a los que están en fase no activa, el tratamiento con el agente inmunogénico liposomado permitiría una reducción en el tiempo de tratamiento con el antibiótico, ya que se reduce considerablemente el número de bacilos que pueden pasar a una fase activa en el transcurso del tiempo.

20

II) Tratamiento con tres dosis de agente inmunoterápico liposomado posterior a un tratamiento de rifampicina e isoniácida

Se dividieron los ratones infectados del tipo 129/Sv en dos grupos:

- Tratados con isoniácida a razón de 25 mg/kg y día durante 5 días a la semana durante cuatro semanas y rifampicina a razón de 10 mg/kg y día durante 5 días a la semana durante cuatro semanas (Control), y

- Tratados además con tres dosis de 180 µg de agente inmunoterápico liposomado, objeto de la invención, inoculadas subcutáneamente después del tratamiento con rifampicina e isoniácida

El tratamiento con el antibiótico isoniácida se inició en la semana 9 y se prolongó durante 4 semanas. En la semana 13 se inició el tratamiento con rifampicina, que finalizó en la semana 17.

En las semanas 17, 19 y 21 se administraron tres dosis de agente inmunoterápico liposomado, objeto de la invención.

En la semana 22, los animales fueron sacrificados y se determinaron las concentraciones bacilares en el pulmón izquierdo y en el bazo de mismos.

La concentración bacilar fue significativamente menor en los pulmones de los animales vacunados, en comparación con el grupo Control, mientras que en el bazo no se encontraron diferencias significativas entre los ratones del grupo Control y los que fueron tratados además con el agente inmunoterápico liposomado.

Los resultados, expresados en \log_{10} UFC/mL, se muestran en la Tabla 2:

Tabla 2

Grupo de ratones	Pulmón	Bazo
Control	2,67±0,83	2,35±1,18
Subcutáneo	1,61±0,58*	1,37±1,02
* = valor estadísticamente significativo con respecto al grupo Control, para $p < 0,05$		

Se puede observar que los ratones tratados por vía subcutánea con el agente inmunogénico liposomado, objeto de la invención, posterior a un tratamiento con los antibióticos isoniácida y rifampicina, presentan un número de bacilos en los pulmones considerablemente inferior al de los ratones que solamente han sido tratados con los antibióticos.

La misma conclusión del apartado I) se puede aplicar en este caso.

III) Tratamiento con tres dosis de agente inmunoterápico liposomado simultáneamente con isoniácida

Se dividieron los ratones infectados del tipo C57BL/6 en dos grupos:

- Tratados solamente con isoniácida a razón de 25 mg /kg y día durante 5 días a la semana durante 8 semanas (Control), y
- Tratados además con tres dosis de 180 µg de agente inmunoterápico liposomado, objeto de la invención, inoculadas intranasalmente

5 En la semana 9 se inició el tratamiento con el antibiótico isoniácida, que se prolongó hasta la semana 17.

Las dosis de agente inmunoterápico liposomado se administraron en las semanas 13, 15 y 17.

10 Los ratones se sacrificaron en las semanas 15 y 28 y se determinaron las concentraciones bacilares en el pulmón izquierdo y en el bazo de mismos.

La concentración bacilar fue significativamente menor en los pulmones de los animales vacunados, después de la administración de una o tres dosis (correspondientes a las semanas 15 y 28 respectivamente), en comparación con el grupo Control.

15 Los resultados obtenidos para los pulmones después de una dosis de agente inmunoterápico (semana 15) y después de 3 dosis (semana 28), expresados en \log_{10} UFC/mL, se muestran en la Tabla 3:

Tabla 3

Grupo de ratones	Semana 15 (1 dosis)	Semana 28 (3 dosis)
Control	2,34±0,24	3,86±0,41
Intranasal	1,59±0,61*	3,48±0,18*
* = valor estadísticamente significativo con respecto al grupo Control, para $p < 0,05$		

20 Se puede observar que los ratones tratados con una sola dosis del agente inmunogénico liposomado por vía intranasal, simultáneamente a un tratamiento con el antibiótico isoniácida, presentan un número de bacilos en los pulmones considerablemente inferior al de los ratones que solamente han sido tratados con el antibiótico.

25 La misma conclusión del apartado I) se puede aplicar en este caso.

En el caso del bazo, la concentración bacilar fue significativamente menor en los animales vacunados después de la administración de las 3 dosis (correspondiente a la semana 28), en comparación con el grupo Control.

Los resultados obtenidos para el bazo, expresados en \log_{10} UFC/mL, se muestran en la Tabla 4:

Tabla 4

Grupo de ratones	Semana 15	Semana 28
Control	1,47 \pm 0,44	3,84 \pm 0,48
Intranasal	1,41 \pm 0,58	3,43 \pm 0,29*
* = valor estadísticamente significativo con respecto al grupo Control, para $p < 0,05$		

Se puede observar que los ratones tratados por vía intranasal con tres dosis del agente inmunogénico liposomado, objeto de la invención, simultáneamente a un tratamiento con el antibiótico isoniacida, presentan un número de bacilos en los pulmones considerablemente inferior al de los ratones que solamente han sido tratados con el antibiótico.

La misma conclusión del apartado I) se puede aplicar en este caso.

IV) Estudio comparativo para estudiar el efecto de los antibióticos, del agente inmunoterápico liposomado y de la interacción entre ambos

Se han realizado ensayos con ratones DBA/2, de acuerdo con un diseño factorial 2^2 , en las condiciones que se muestran en la tabla 5:

Tabla 5

Ensayo	Antibiótico	Agente inmunoterápico liposomado
1	No	No
2	Sí	No
3	No	Sí
4	Sí	Sí

En el ensayo 1, los ratones infectados se mantuvieron sin ningún tipo de tratamiento.

En el ensayo 2, los ratones infectados fueron tratados solamente con el antibiótico isoniacida a razón de 25 mg/kg y día durante 5 días a la semana durante 4 semanas y rifampicina a razón de 10 mg/kg y día durante 5 días a la semana durante 4 semanas, a partir de la semana 9 posterior a la infección.

En el ensayo 3, los ratones infectados fueron tratados solamente con tres dosis de 180 µg de agente inmunoterápico liposomado administradas subcutáneamente en las semanas 9, 11 y 15 posteriores a la infección.

En el ensayo 4, el tratamiento con el antibiótico isoniacida se inició en la semana 9 y se prolongó durante 4 semanas. En la semana 13 se inició el tratamiento con rifampicina, que finalizó en la semana 17. En las semanas 17, 19 y 21 se administraron tres dosis de agente inmunoterápico liposomado, objeto de la invención.

En la semana 22, todos los animales fueron sacrificados y se determinaron las concentraciones bacilares en el pulmón izquierdo. Los resultados obtenidos para el pulmón, se expresan en \log_{10} UFC/mL, se muestran en la Tabla 6:

Tabla 6

Ensayo	Antibiótico	Agente inmunoterápico liposomado	\log_{10} UFC/mL
1	No	No	5,37±0,27
2	Sí	No	3,29±0,8*
3	No	Sí	5,69±0,22
4	Sí	Sí	0,69±0**
* = valor estadísticamente significativo con respecto a los ensayos 1,3 y 4 para $p<0,05$;			
**= valor estadísticamente significativo con respecto a los ensayos 1,2 y 3 para $p<0,05$.			

Se puede observar que el tratamiento combinado de los antibióticos isoniacida y rifampicina con el agente inmunoterápico liposomado, objeto de la invención, conduce a una reducción del número de bacilos considerablemente mayor que el uso de cualquiera de los dos factores (antibióticos y agente inmunoterápico liposomado) por sí solos.

Teniendo en cuenta, que el número de bacilos determinado incluye a los que están en fase activa y a los que están en fase no activa, el tratamiento combinado del agente inmunogénico liposomado en asociación con otros fármacos permitiría una reducción en el tiempo de tratamiento con dichos fármacos, ya que se reduce

5 considerablemente el número de bacilos que pueden pasar a una fase activa en el transcurso del tiempo.

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un procedimiento para la obtención de un agente inmunoterápico que comprende fragmentos de pared celular de una cepa virulenta de *Mycobacterium tuberculosis*-complex (MTB-C), dicho procedimiento caracterizado porque comprende las siguientes etapas:
- cultivar la cepa virulenta MTB-C durante un período de tiempo igual o superior a tres semanas y, posteriormente,
 - 10 - homogeneizar el cultivo de células en presencia de un tensioactivo no iónico.
- 2.- Un procedimiento según la reivindicación 1 caracterizado porque el período de tiempo de cultivo está comprendido entre 3 y 4 semanas.
- 3.- Un procedimiento según las reivindicaciones 1 o 2 caracterizado porque el tensioactivo no iónico se selecciona entre el grupo de los alquilfenoles etoxilados y los ésteres de sorbitán etoxilados.
- 15 4.- Un procedimiento según la reivindicación 3 caracterizado porque el tensioactivo no iónico se selecciona entre los octilfenoles etoxilados.
- 5.- Un procedimiento según la reivindicación 4 caracterizado porque el tensioactivo no iónico se selecciona entre los octilfenoles etoxilados con 7-8 moles de
- 20 óxido de etileno.
- 6.- Un procedimiento según las reivindicaciones 1 a 5 caracterizado porque la homogeneización se efectúa en un medio tamponado a pH neutro.
- 7.- Un procedimiento según las reivindicaciones 1 a 6 caracterizado porque comprende además las siguientes etapas:
- 25 - separar mediante centrifugación las células no fragmentadas y los componentes solubilizados,
 - someter a tratamiento químico o físico la fracción de fragmentos de pared celular para inactivar las eventuales células de cepa virulenta que eventualmente contenga, y
 - 30 - desecar el agente inmunoterápico obtenido mediante liofilización.
- 8.- Un agente inmunoterápico obtenible mediante un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

9.- Una composición farmacéutica que comprende el agente inmunoterápico de la reivindicación 8.

10.- Una composición farmacéutica según la reivindicación 9 que comprende el agente inmunoterápico en forma de liposomas.

5 11.- El uso del agente inmunoterápico de la reivindicación 8 para la preparación de un medicamento para el tratamiento combinado de la tuberculosis en asociación con otros fármacos.

12.- El uso según la reivindicación 11 caracterizado porque los fármacos son la isoniacida y/o la rifampicina.

RESUMEN

La presente invención se refiere a un agente inmunoterápico basado en fragmentos de pared celular de una cepa virulenta de *Mycobacterium tuberculosis*, a un
5 procedimiento para obtenerlo, a formulaciones farmacéuticas que lo contienen, y a su uso para la preparación de un medicamento para el tratamiento combinado de la tuberculosis en asociación con otros fármacos.